

CONTRAST MEDIUM FOR ULTRASONIC WAVE IMAGING**Publication number:** JP5194278**Publication date:** 1993-08-03**Inventor:** JIYOSUFU YUDERUSON; SUUZAN II PAWAA**Applicant:** STERLING WINTHROP INC**Classification:****- International:** **A61K9/107; A61K47/42; A61K49/00; A61K49/22;**
A61K9/107; A61K47/42; A61K49/00; A61K49/22;
(IPC1-7): A61K9/107; A61K47/42; A61K49/00**- European:** A61K49/22P8**Application number:** JP19920323081 19921202**Priority number(s):** US19910803293 19911204**Also published as:**

EP0547654 (A1)

US5196183 (A1)

FI925526 (A)

Report a data error here**Abstract of JP5194278**

PURPOSE: To obtain the subject contrast agent containing cores encapsulated with human serum albumin, having a prescribed average diameter, exhibiting a high scattering intensity, excellent in storage stability and image visibility, and useful as an imaging agent for diagnosis, etc. **CONSTITUTION:** This contrast agent contains the cores of one or more kinds of 6-18C fatty acids (e.g. caproic acid) encapsulated with human serum albumin and has an average particle diameter of $\leq 12\mu\text{m}$, preferably $0.1\text{--}8\mu\text{m}$. The human serum albumin and the fatty acid are preferably used in a weight ratio of 10/1 to 1/1.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-194278

(43) 公開日 平成5年(1993)8月3日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 49/00	C	9164-4C		
9/107	C	7329-4C		
47/42	D	7433-4C		

審査請求 未請求 請求項の数9(全 5 頁)

(21) 出願番号	特願平4-323081	(71) 出願人	591245646 スターリング ウィンスロップ インコーポレイティド アメリカ合衆国, ニューヨーク 10016, ニューヨーク, パーク アベニュー 90
(22) 出願日	平成4年(1992)12月2日	(72) 発明者	ジョセフ ユデルソン アメリカ合衆国, ニューヨーク 14610, ロチェスター, カルメット ストリート 77
(31) 優先権主張番号	8 0 3 2 9 3	(72) 発明者	スーザン イー. パワー アメリカ合衆国, ニューヨーク 14610, ロチェスター, オードボン ストリート 1, アpartment 1
(32) 優先日	1991年12月4日	(74) 代理人	弁理士 青木 朗 (外4名)
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 超音波イメージング用造影剤

(57) 【要約】

【目的】 ヒト血清アルブミンでカプセル化した脂肪酸のコアを含む平均直径12ミクロン以下の粒子からなる超音波診断用イメージング剤。

【効果】 生体内において安定で超音波に対して高い散乱強度を示す。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 平均直径12ミクロン以下の粒子を含んでなる診断イメージング剤であって、前記粒子がヒト血清アルブミンでカプセル化した1種以上の脂肪酸のコアを含むことを特徴とするイメージング剤。

【請求項2】 前記脂肪酸が炭素原子6～18個を有する請求項1記載のイメージング剤。

【請求項3】 コレステロールをさらに含む請求項1記載のイメージング剤。

【請求項4】 ヒト血清アルブミン対脂肪酸の重量比が10:1～1:1である請求項1記載のイメージング剤。

【請求項5】 平均直径12ミクロン以下の粒子であって、ヒト血清アルブミンでカプセル化した1種以上の脂肪酸のコアを含んでなる診断イメージング剤の調製方法において、ヒト血清アルブミンでカプセル化した脂肪酸の微粒子分散体を形成する工程、および得られた分散体を加熱してヒト血清アルブミンを凝固させる工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項6】 (a) 溶媒に脂肪酸を溶解することにより脂肪酸溶液を調製する工程、(b) この脂肪酸溶液をヒト血清アルブミンと混合してヒト血清アルブミンで被覆した脂肪酸の微粒子分散体を形成する工程、および(c)得られた分散体を激しく攪拌しながら約90℃の温度で加熱してヒト血清アルブミンを凝固させる工程、を含んでなる請求項5記載の方法。

【請求項7】 (a) 脂肪酸塩溶液を酸性化して脂肪酸の乳濁液を形成する工程、(b) ヒト血清アルブミンを添加する工程、および(c)加熱してヒト血清アルブミンを凝固させる工程、を含んでなる請求項5記載の方法。

【請求項8】 工程(b)の前に気体で脂肪酸溶液を泡立てる請求項6記載の方法。

【請求項9】 気体が酸素を含んでなる請求項8記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、診断イメージングの技術分野に関する。より具体的には、本発明は超音波イメージングとして知られる診断イメージング法を使用する場合に得られる画像を改良するための造影剤に関する。

【0002】

【従来の技術】超音波によるヒトおよび動物の内臓の検査は、かなり前に導入され、異なるタイプの組織間の境界面におけるメガヘルツ範囲内(1MHz以上)にある超音波の反射に基づく診断方法である。こうして発生したエコーが増幅され、次いで画像表示される。これに関して特に重要なことは、心エコーグラフィ（Mモードと2次元心エコーグラフィとによる心臓疾患の診断に使用される）用造影剤にある。

【0003】超音波イメージングは、ある物質に向けら

れた超音波の一部が画像を形成すべき領域の表面に置かれたプローブによって反射(散乱)され、そして受容されるような音響特性である、物質を通過する超音波エネルギーの透過に関連する。散乱波の強度は、散乱中心の大きさ、ならびに散乱中心と周囲の媒体間の密度および圧縮率の差異に強く依存する。得られた画像(散乱された超音波のスクリーンに画像表示される電気信号への変換によって得られる)は、鮮鋭さや明瞭さに欠ける場合がよくある。従って、血流に注入した場合に、散乱波の強度を高めて得られる画像の鮮鋭さと明瞭さを向上し、心臓および他の器官の血流を観察する限界を高めうる生体適合性造影剤の設計に多大な努力が注がれてきた。

【0004】超音波心エコーグラフィ用各種造影剤、例えば不安定化過酸化水素溶液、二酸化炭素で高められた不安定化塩化ナトリウム溶液、ゼラチンカプセル化微泡および他の方法で安定化された微泡が、既に公表されている(米国特許第4,572,203号、同4,718,433号、同4,774,958号および同4,844,882号明細書参照)。従来、これらの造影剤のいずれも安定化(または不安定化)微泡から構成されていた。

【0005】モレキュラー・バイオシステムズ(Molecular Biosystems)から販売されているALBUNEXは、ヒト血清アルブミン(HSA)の溶液を超音波処理することで調製された微泡からなる。ECHOVISTおよびLEVOSTを始めたヨーロッパでの研究に基づく他の系は、一定量の気泡を取り込んだガラクトース粒子懸濁液からなるイメージング剤である。これらの泡系のどれも、心臓収縮期の血圧(すなわち、130mmHg以上)に近い圧力がかけられたとき不安定になる。メルツァー(Meltzer)と共同研究者は、HSA微泡が120mmHgで10秒間の半減期を示し、ECHOVISTが1～2分内にその活性を半分に低減することを示す。より高い圧力では、その速度は著しく高まる(Meltzer, R. S.ら、Advance in Echocardiography Conference, 10/4-5/90, Chicago, IL)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】血流に見られる圧力に抵抗性の超音波造影剤に対するニーズが存在する。このような物質は、例えば、造影剤を遠末梢静脈または動脈に注入した後、心臓、肝臓および他の器官を灌流する血液の可視化に際し、従来、上記造影剤を含む微泡が利用しがたいものであった組織および器官を可視化しうるものであろう。また、造影剤は生体適合性材料から構成され、そして肺の毛細血管床を容易に通過するような粒子サイズ分布を有することも必要である。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、血流で見られる圧力に非常に高い安定性を示すヒト血清アルブミン(HSA)と脂肪酸からなる粒子を調製できることを

見出した。これらの粒子は、現在利用できる微泡物質で得られるのと同様以上のレベルで超音波を散乱する。より具体的には、本発明はヒト血清アルブミンでカプセル化した脂肪酸のコアを含んでなる超音波イメージング剤を提供する。

【0008】もう一つの態様としては、本発明は、(a) 溶媒に脂肪酸を溶解することによる脂肪酸溶液の調製工程、(b) この脂肪酸溶液をHSA溶液と混合してHSAで被覆した脂肪酸の微粒子分散体を形成する工程、(c) 得られた分散体を激しく攪拌しながら約90℃の温度で加熱してHSAを凝固させる工程、を含んでなる超音波イメージング剤の調製方法を提供する。加熱は、アルブミン粒子を安定な網状構造に架橋し、そして使用される可能性のある低沸点(有機)溶媒を留去する。水混和性の有機溶媒を一般に選択するが、水と混和しない溶媒の使用も可能である。

【0009】本発明の別法では、脂肪酸分散体を脂肪酸の塩(代表的にはナトリウム塩)溶液を酸性化することによって調製して脂肪酸の乳濁液を形成する。HSAを添加した後、加熱してHSAを凝固させる。この方法では、脂肪酸用溶媒の使用が避けれる。

【0010】

【具体的な態様】本発明のイメージング剤は、平均直径0.1~12ミクロン、好ましくは0.1~10ミクロン、より好ましくは0.1~8ミクロンを有する必要がある。本発明のイメージング剤を形成するのに使用可能な脂肪酸は、炭素原子6~18個をもつ。それは、飽和 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}]$ 、式中、 n は4~16の整数である]または不飽和の直鎖または分岐鎖であることができる。体温(32℃)において液体であることが好ましい。また、脂肪酸混合物も適する。これらの混合物は32℃で通常固体である脂肪酸と、同時に32℃で液体である脂肪酸を含んでもよいが、混合物が32℃で液体であることが好ましい。

【0011】本発明のイメージング剤を調製する際の使用に適する脂肪酸類の具体例としては、カプロン酸、ミリスチン酸、オレイン酸、ヘキサン酸、ステアリン酸、カプリン酸、イソステアリン酸、パルミチン酸およびラウリン酸が挙げられる。本発明のイメージング剤の脂肪酸部は、脂肪酸類と生理学的適合性の補助剤(32℃で液体である補助剤が好ましい)の重量基準で50重量%以下を含むことができる。このような補助剤としては、油類(例えば、コレステロール)および界面活性剤を挙げることができる。それらは、エコー発生率(echogenicity)を高め、粒子サイズを制御するなどの効果を奏する可能性がある。

【0012】また、HSAは、器官における免疫反応を防ぐか、または滞留時間を延長する目的でポリアルキレングリコールの付加により変性されていてもよい。また、本発明のイメージング剤粒子中のHSA部と脂肪酸

部の割合は、重量基準で約10:1~約1:1、好ましくは6:1~3:1、より好ましくは約4:1である。

【0013】本発明の一つの態様では、本発明のイメージング剤はHSA溶液中で脂肪酸を沈殿させ、次いで加熱してHSAを凝固させることにより調製される。許容できる粒子サイズ分布を得るために、この操作中十分な攪拌または混合を行う。本発明の好ましい態様の方法では、所望の攪拌を得る目的で超音波処理しながら、HSA溶液に脂肪酸を注入することにより沈殿を行う。すべての適する攪拌速度が使用できるが、60~600RPMの範囲内の速度によるのが好ましい。また、エコー発生率は攪拌速度を高めれば高めるほど増大することが見出された。

【0014】本発明の別法では、本発明のイメージング剤は、まず最初に脂肪酸のナトリウム塩溶液を酸性化することにより脂肪酸の水性分散体を調製し、次いでこの分散体をHSAと混合した後、加熱によりHSAを凝固する。この方法の好ましい態様の一つは、得られた粒子のエコー発生率を高めるのに、脂肪酸分散体に気体を通して泡立たせた後、それをHSAと混合する。好ましくは、ガスは酸素であるが、他の生物学的に許容される気体も使用できる。この態様では、気体による分散体の泡立ては少なくとも8時間、より好ましくは少なくとも24時間行う。ある例(実施例6参照)では、6日間の酸素による泡立てが実質的にエコー発生率を高めることが観察された。

【0015】好ましくは、沈殿後の加熱工程は、徐々に、そして少なくとも約45分間、好ましくは少なくとも約1時間続ける。實際上、イメージング剤は、生理的に許容される液体中の本発明の粒子分散体状で被検者に注入される。一般に、この分散体は固形分を0.1~3%(重量/容量)、好ましくは0.1~2%(重量/容量)、より好ましくは約1.5%(重量/容量)有する。

【0016】

【実施例】

例1: HSAとミリスチン酸からなる超音波造影剤の調製

テトラヒドロフランに溶解したミリスチン酸の7%溶液3.5mLを、ヒト血清アルブミンの2%溶液をHeat Systems WP 375 ソニケーターの出力にさらしながらその溶液2.5mLに注入した。温度を51℃(この温度はHSAの凝固温度よりかなり低い)にした後、得られた分散体を3分間超音波処理した。次に、分散体を攪拌(約60RPM)しながら、温度を約95℃に達するまで加熱した。加熱工程に要した総時間は約55分であった。この時点で、分散体は実質的にテトラヒドロフランを含まず、半透明状であった。これらの粒子は、約6ミクロンの平均直径であった。この分散体試料を7MHz照射で試験したところ、約11mV(ミリボルト)レベルの非常に良好な

散乱を示した。この値は、水の値よりも少なくとも1桁大きな値である。

【0017】例2：高攪拌速度の使用

例1に記載した操作に従いHSA／ミリスチン酸イメージング剤の調製を繰り返したところ、エコー発生率19mVを示すイメージング剤が得られた。攪拌速度を1桁高め（60RPM から600RPM へ）て同様の調製法を実施した。これは、多量の空気によるホイピングを伴う。多量の空気を取り込んだ泡は、分散体を24時間静置することによって除去した。この時、大きな泡は液の上方に上昇してくるので、試験する試料は容器の底部から採取した。この調製物のエコー発生率は57mVであった。上記のように、この測定は多量の空気を取り込んだ泡に影響を受けないように注意した。このような泡の存在は、3000倍の顕微鏡検査では見られなかった。この倍率では、直径0.2ミクロンを越える泡を認識できる。これらの粒子は約1～12ミクロンの範囲にある直径を有していた。室温条件下で1ヶ月保存した後、エコー発生率は実質的に同じ（54mV）であった。

【0018】比較の目的で、HSAの2%溶液を約600RPM で激しく攪拌した。最初のうち（攪拌直後）は、これも高いエコー発生率（50mV以上）を示した。しかし、約1分でシグナルがバックグラウンドをわずかに上回る（約2mV）にすぎない程、急激に散乱強度は低下した。

例3：各種の脂肪酸を使用するHSA／脂肪酸造影剤の調製

例1に記載した方法に従い、パルミチン酸、オレイン酸、ラウリン酸およびステアリン酸とHSAとの分散体を調製した。これらのすべてが非常に高いエコー発生率（30mVを越える）を示した。

【0019】例4：水に非混和性有機溶媒の使用

テトラヒドロフランに代えヘキサンを使用したこと以外、例1に記載したようにHSA／ミリスチン酸の分散体を調製した。この方法では、ヘキサン溶液をHSAと混合したとき水中油乳濁液が形成された。次いで加熱したところ、ヘキサンが留去すると共に、HSA中に分散された脂肪酸が残存した。この方法で調製した分散体（固形分濃度約1.9%）は、テトラヒドロフランを使用して得たものとほぼ同等のエコー発生率（27mV）を示した。

【0020】例5：別法（有機溶媒不使用）

水中オレイン酸ナトリウムの0.5%溶液試料50mLを、最終pHが3.5になるように0.1N HClを滴下した。オレイン酸懸濁液の形成にともなって溶液は非常に混濁してきた。光学顕微鏡で測定したところ、粒子サイズは0.1ミクロン以内であった。この乳濁液にヒト血清アルブミンの30%水溶液を加え、アルブミンの最終濃度を2.0%とした。次に、最終温度が94℃になるように60分間かけてゆっくり攪拌しながら前記

混合物を加熱した。水（1.2mV）に比べて測定されたエコー発生率は15.9mVであった。

【0021】例6：エコー発生率を高めるための酸素の使用

例5に記載したようにオレイン酸乳濁液を調製し、次いでそれに純粋な酸素を6日間通して発泡させた。上記のように、ヒト血清アルブミンを加え、30分間ゆるやかに攪拌しながら混合物を加熱した（最終の温度は94℃であった）。エコー発生率は、水（1.2mV）に対し、93mVと測定された。

【0022】本発明はいずれの理論にも拘束されるものでないが、酸素はオレイン酸によって容易に吸収されるものと思われる。加熱を通じて、溶存酸素がオレイン酸の表面に吸着され、そのまま、オレイン酸をカプセル化するアルブミン（その凝固温度を越える加熱で）によって取り込まれるものと想像される。これらの気泡は、非常に小さく（3000倍では観察不能）、そしてイメージング剤中に非常に安定であるものと考えられる。他の気体、例えばアルゴン、窒素、二酸化炭素、クリプトンおよび酸化窒素も同様な効果を奏するものと思われる。

【0023】従って、この例の酸素富化法を使用しない場合であっても、本発明のイメージング剤粒子のエコー発生率は、脂肪酸とHSAとの間の境界面に、おそらく取り込まれるカプセル化された酸素の微泡に影響される可能性がある。

例7：希釈の影響

例6に記載したように分散体を調製した。それらは平均粒子サイズ8ミクロンであった。2.5%固形分におけるエコー発生率は35mVであった。このものを、水の添加によりもとの濃度の1/2に希釈してエコー発生率を測定した。この希釈を、もとの濃度の1/32になるまで繰り返した。この一連の試験データを下記に示す。

【0024】

濃 度	エコー発生率 (mV)
2.5%	35
1.25%	87
0.625%	78
0.31%	27
0.155%	17
0.078%	7.5

これらのデータは、この系が0.1%未満の濃度で良好な散乱レベルを保持することを示す。

【0025】例8：加熱前にオレイン酸分散体へ少量のオレイン酸ナトリウムを添加する効果

例6に記載したように分散体を調製した。2.0%固形分におけるエコー発生率は20mVであった。加熱前に少量のオレイン酸ナトリウム（HSAの2重量%）を加えて別の分散体を調製した。この分散体のエコー発生率は、同じ固形分と粒子サイズで36mVであった。

【0026】例9：圧力の影響

例2に記載したように調製したHSA/パルミチン酸粒子分散体試料に30分間160mmHgの圧力をかけた。加圧の前後でエコー発生率は殆ど変化を示さなかった（どちらも70mV）。このことは、これらの造影剤の圧力変化に対する安定性を示す。

【0027】例10：脂肪酸の希釈効果

コレステロールとミリスチン酸の割合が1:1、2:1および1:2となるように脂肪酸（この例ではミリスチン酸）の一部をコレステロールで置き換えたこと以外、例1に記載したように一連の分散体を調製した。高ミリスチン酸レベルを含有する試料だけが、高い散乱レベルを示した。すなわち、脂肪酸でない油（例えば、コレステロール）は、安定なエコー発生粒子を創製する程HSAに十分な親和性をもたない。それらは、むしろ希釈剤として作用し、より重要でない性質に耐えるに過ぎない。

【0028】例11：脂肪酸のアルコールによる代替効果（比較例）

ミリスチン酸に代えてミリスチルアルコールを使用したこと以外、例1に記載したように分散体を調製した。このアルコールは、1-テトラデカノールとしても知られている。散乱レベルはミリスチン酸で得られるものよりかに低く、本発明の実施に際し脂肪酸を脂肪族アルコールで代替できないことを示す。

【0029】例12：HSAのデキストランによる代替効果（比較例）

HSAをデキストランポリマーで代替したこと以外、例

1に記載したように分散体を調製した。ミリスチン酸の優れた分散体を生成したが、非常に低いエコー発生率（2.8mV）が得られるにすぎなかった。このことは、本発明の実施に際してHSAの独自性を示す。

【0030】例13：脂肪酸を含まない対照例

脂肪酸を省略したことを除き例1の操作に従って対照実験を行った。散乱はまったく観察されなかった。このことは、本発明で脂肪酸が必要なことを示す。

例14：心臓の左側部イメージングの実施

10 例1に記載したように調製した分散体を、ウサギの右心室に注入し、左心のイメージングを観察したところ、造影剤は肺動脈の毛細血管床を通過し、肺を通過して左心室まで移動したことを示した。さらに、この同じ注入から優れた肝臓での消費が観察された。良好な左室のイメージング結果は、また、耳の静脈を介して注入を行ったときにも得られた。これらの実験は、7.5Mhz照射のアクソンイメージャー（Acuson Imager）を使用して Center for Pharmaceutical and Imaging Research at the Massachusetts General Hospital で行った。

20 【0031】

【発明の効果】ヒト血清アルブミンでカプセル化した脂肪酸コアを含む約12ミクロン未満の平均直径を有する粒子およびそれらの調製方法が開示される。これらの物質は、超音波イメージングの造影剤として有用であり、そして分散微泡から得られる分散強度と同等以上の強度を示す。さらに、分散微泡に基づく造影剤よりも保存に安定であるだけでなく生体内での使用にも安定である。